

DIVERSITE GENETIQUE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN FILIERE DINDE

**Houard Emmanuelle, Rouxel Sandra, Labbé Annie, Courty Céline,
Chemaly Marianne**

*Anses, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Laboratoire de Ploufragan,
BP 53, 22440 Ploufragan – UEB, Université Européenne de Bretagne, France*

Emmanuelle.houard@anses.fr

RESUME

Listeria monocytogenes est une bactérie d'origine alimentaire responsable de la listériose, maladie infectieuse rare mais avec des conséquences graves. Les objectifs de ce travail sont (i) d'étudier la diversité génétique des isolats de *Listeria monocytogenes* issus de la filière dinde en France, (ii) de tracer et d'identifier les types de contamination de l'élevage jusqu'au produit fini. Cent treize isolats ont été récoltés lors d'enquêtes dans les élevages de reproduction et de chair, et 192 isolats d'un plan de surveillance visant les produits à la distribution. Au total, 305 isolats ont été sérotypés et génotypés par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) avec l'enzyme de restriction Asc I. Les profils PFGE obtenus ont été comparés à l'aide du logiciel BioNumerics 6.5 (Applied Maths). L'indice de Simpson a été calculé pour estimer la diversité génétique des isolats. Trente et un pulsotypes distincts ont été obtenus. L'indice de Simpson (ID) obtenu pour les isolats issus des élevages de reproduction et de chair est de 0,723. Celui des produits à la distribution est de 0,898. Le sérotype IIa est majoritaire et représente 84,6 % des isolats. La diversité génétique des isolats pour ce sérotype est faible avec un ID de 0,698.

Sur les 31 pulsotypes identifiés, un profil est retrouvé commun aux 3 stades de la chaîne, un autre est commun entre les stades de reproduction et d'élevage et un troisième identique à l'élevage et la distribution. Ce dernier est majoritaire sur les produits à la distribution avec en plus 20 autres profils identifiés. Les résultats montrent une contamination croisée et persistante à la distribution : les mêmes pulsotypes sont retrouvés sur des produits différents (carcasse, rôti, cuisse) toute l'année ou au moins sur 2 saisons. Cette première enquête épidémiologique moléculaire en filière dinde révèle que les élevages de reproduction et de chair peuvent être à l'origine de la contamination par *Listeria monocytogenes* des produits finis mais d'autres sources de contamination existent en raison de la diversité observée.

ABSTRACT

Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in turkey production

Listeria monocytogenes is a foodborn pathogen responsible of listeriosis, rare infectious disease but with severe consequences. The aim of this work was to study the genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in turkey production in France, to trace and identify the contamination from "farm to fork". A total of 305 isolates were collected: 113 from breeding and rearing turkey flocks and 192 from a monitoring plan on turkey meat products in retail outlets. These isolates were serotyped and genotyped by pulsed-field electrophoresis using the restriction enzyme AscI. The genetic patterns were compared with BioNumerics 6.5 software (Applied Maths). The Simpson's index was calculated to estimate the genetic diversity of the isolates.

Thirty-one profiles were obtained. The discriminatory index for the isolates of breeding and rearing flocks was 0.723. The one of isolates from retail was 0.898. The serogroup IIa was prevalent between all levels (farms, breeding flocks and retail) and represented 84.6% of isolates. The index of discrimination for this serogroup was 0.698. Among the 31 profiles, one pattern was common to the three levels, one was common to breeding and rearing and one to rearing and retail. The latter was predominant on retail products. Moreover, 20 others profiles were identified. These results showed a cross contamination and a persistent contamination: the same profiles are present on all types of products (thighs, roasts, carcasses) and in all seasons or at least 2 seasons.

This first molecular epidemiological survey in turkey production indicated that breeding and rearing flocks could contaminate finished products by *Listeria monocytogenes* but other sources of contamination exist due to the diversity observed.

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes, est une bactérie d'origine alimentaire et fréquemment isolée de l'environnement. Ce pathogène est responsable de la listériose, maladie infectieuse rare mais potentiellement grave. Les personnes les plus exposées sont les sujets âgés, les femmes enceintes, les jeunes enfants et les personnes immuno-déprimées. La transmission se fait essentiellement par l'ingestion d'aliments contaminés par *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie se multiplie aussi bien à basse température qu'à température ambiante et est capable de persister dans les ateliers et les équipements agro-alimentaires, mais, elle peut être détruite par la chaleur. Maladie à déclaration obligatoire, 1642 cas de listériose ont été recensés en Europe en 2012 (EFSA, 2014) et 348 cas déclarés et confirmés en France en 2012 (EFSA, 2014).

Plusieurs études ont été conduites dans la filière de la volaille en France pour estimer la prévalence de *Listeria monocytogenes* et les facteurs de risque dans les élevages de poules pondeuses (15,5 %), de poulets de chair (31,7 %) (Chemaly et al., 2008 ; Aury et al., 2011) et dans les élevages reproducteurs (12 %) et les élevages de chair (9,3 %) en filière dinde (Aury-Hainry et al., 2011).

Les objectifs de ce travail sont (i) d'étudier la diversité génétique des isolats de *Listeria monocytogenes* récoltés lors de deux enquêtes réalisées en filière dinde (élevages et distribution), (ii) de tracer et d'identifier les types de contamination de l'élevage jusqu'au produit fini.

1. MATERIELS ET METHODE

1.1. Matériels

Cent soixante trois élevages de dindes ont fait l'objet d'une enquête en 2006-2007 dans 18 départements répartis essentiellement dans le quart nord-ouest de la France. Soixante quinze élevages sont des élevages reproducteurs et 86 sont des élevages de chair. Les élevages positifs (17) ont permis de récolter 113 isolats de *Listeria monocytogenes* dont 63 proviennent des élevages reproducteurs et 50 des élevages de chair.

Au niveau de la distribution, 323 produits de viande de dinde (carcasse, rôti, cuisse) ont été analysés en 2010 dans 10 départements français. Les produits ont été prélevés dans diverses enseignes de grande et moyenne surface tout au long de l'année. Les produits positifs (45) ont permis de récolter 192 isolats de *Listeria monocytogenes*.

1.2. Méthode

Au total, 305 isolats de *Listeria monocytogenes* ont été sélectionnés suite aux enquêtes épidémiologiques qui ont eu lieu pour estimer la prévalence de *Listeria*

monocytogenes dans les élevages et les produits à la distribution (Aury et al., 2011 ; Chemaly, 2011) en incluant un isolat par échantillon et par élevage. Les isolats ont été sérotypés par agglutination et par PCR (Kerouanton et al., 2009) et génotypés suivant la méthode PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) avec l'enzyme de restriction Asc I en raison de son pouvoir discriminant aussi important que deux enzymes combinées (Asc I et Apa I) selon Courtillon et al., 2010. Cette méthode consiste à extraire l'ADN bactérien dans des blocs d'agarose, à effectuer une macrorestriction enzymatique avec Asc I et à révéler les profils par électrophorèse en champs pulsés. Les profils génétiques obtenus ont été comparés à l'aide du logiciel BioNumerics 6.5 (Applied Maths). Des dendrogrammes ont été créés en utilisant le coefficient de Dice et la méthode de groupage UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Averages). Pour estimer la diversité génétique des isolats, l'indice de Simpson a été calculé (Hunter et Gaston, 1988).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le sérotypage des isolats a montré que le séro groupe IIa est majoritaire aux 3 niveaux de la production de dindes (reproduction, élevage et distribution) et représente 84,6 % des isolats de *Listeria monocytogenes*. Les sérogroupes IIb, IIc et IVb représentent respectivement 6,9%, 6,2% et 2,3% des isolats. L'indice de Simpson des isolats de dindes pour le séro groupe IIa est de 0,698. Cet indice est plus faible que celui observé dans d'autres enquêtes pour ce même séro groupe qui était supérieur à 0,9 (Courtillon et al., 2010 ; Rivoal et al., 2013). Les résultats du génotypage montrent également une faible diversité génétique au sein des isolats issus des élevages de dinde (ID=0,723) en comparaison avec les isolats de poulets de chair (ID=0,968). Au niveau de la distribution, les isolats ont présenté une diversité génétique plus importante qu'à l'élevage (ID=0,898). La diversité, plus élevée à la distribution que dans les élevages, indiquerait des sources de contamination des produits variées.

L'analyse des 3 niveaux de production fait apparaître 31 profils génétiques (figure 1) dont trois en commun avec les différents stades de la chaîne. Un profil C85 est retrouvé commun aux 3 stades. Ce profil est majoritaire dans les élevages (50 %). Un autre profil C74 est retrouvé identique à l'élevage et à la distribution. Ce profil est majoritaire à la distribution (22 %). Un troisième profil C87 est commun entre les deux stades de l'élevage (reproduction et chair) et n'a pas été retrouvé sur les produits. Ces résultats montrent que bien que certains isolats soient dominants à l'un des stades de la chaîne, ils sont capables de s'adapter aux conditions des étapes successives du process. Les 28 autres pulsotypes sont uniques à un des niveaux de la production.

Au niveau des produits de la distribution (figure 2), trois profils prédominants, le C74 (22 %), le C12 (18 %) et le C85 (9 %) sont présents sur les 3 types de produits prélevés : carcasse, rôti, cuisse. Le C74 est présent tout au long de l'année alors que le C12 et le C85 sont présents pendant au moins deux saisons. Parmi les 22 profils identifiés à ce stade, 12 sont communs à au moins 2 types d'échantillons. Les mêmes pulsotypes sont retrouvés sur des produits différents et à des périodes différentes de l'année. Ces résultats montrent donc une contamination croisée et persistante.

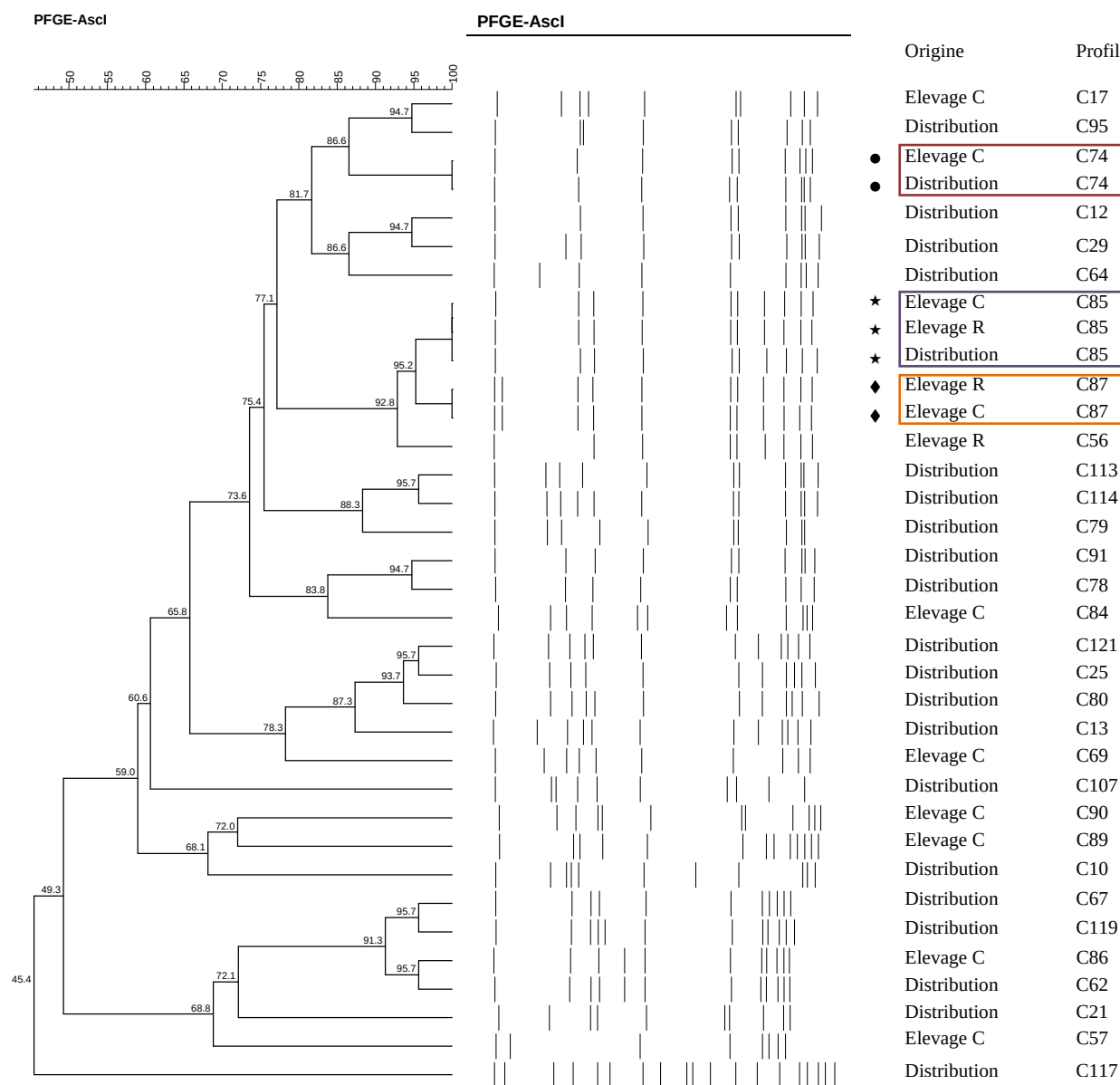
Cette première enquête d'épidémiologie moléculaire en filière dinde révèle que les élevages de reproduction et de chair peuvent être à l'origine de la contamination par *Listeria monocytogenes* des produits finis. Certains isolats introduits par l'élevage (avec le profil C74), peuvent s'adapter à l'environnement du process et persister sur les produits destinés au consommateur. Par ailleurs, la diversité génétique des isolats observée à la distribution suggère l'existence d'autres sources de contamination des produits finis.

CONCLUSION

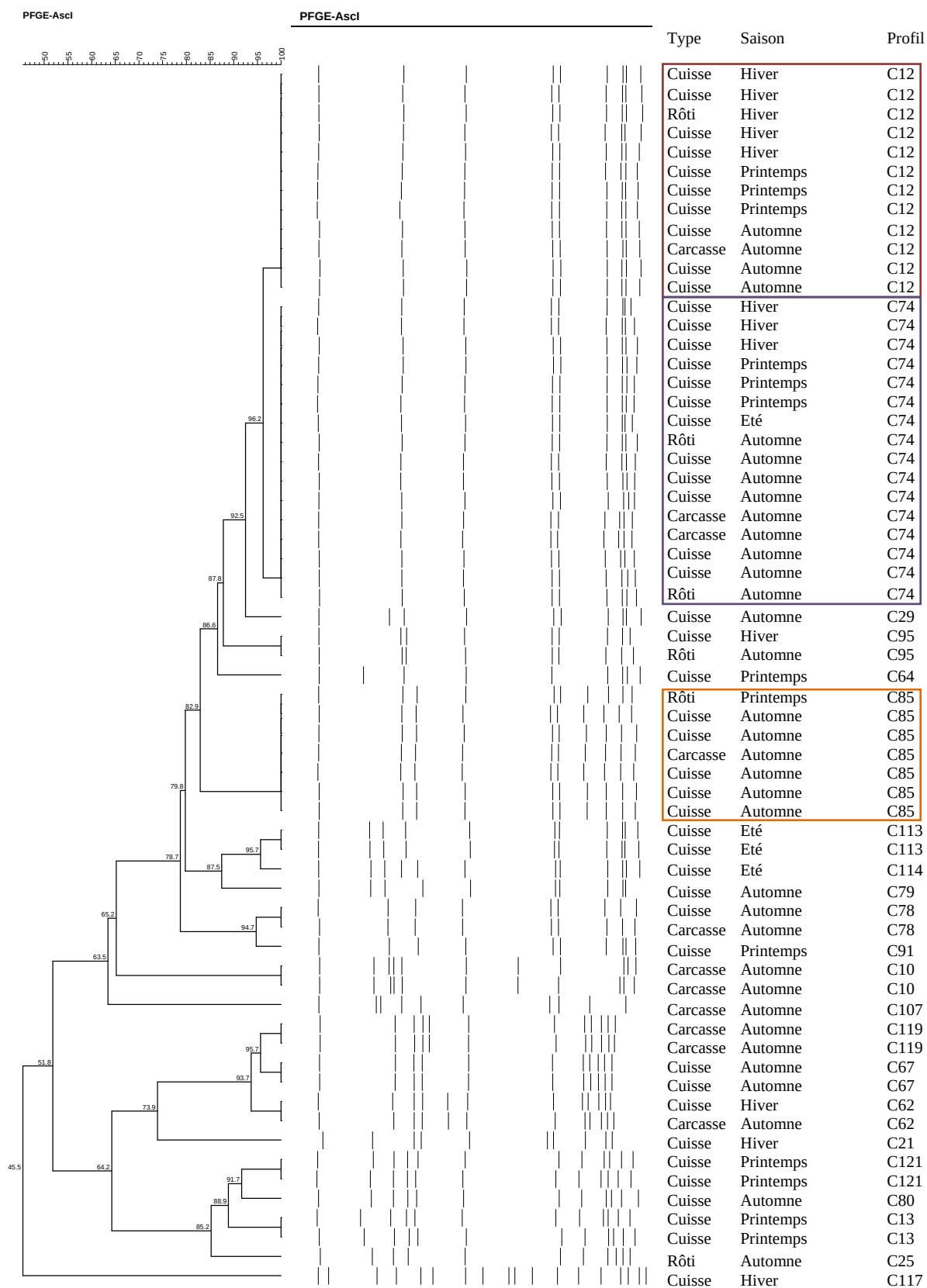
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aury K., Le Bouquin S., Toquin M.T., Huneau-Salaün A., Le Nôtre Y., Allain V., Petetin I., Fravalo P., Chemaly M., 2011. *Prev. Vet. Med.*, (98), 271-278.
2. Aury-Hainry K., Le Bouquin S., Labbé A., Petetin I., Chemaly M., 2011. *J. Food. Prot.*, (74), 1096-1103.
3. Chemaly M., Toquin M.T., Le Nôtre Y., Fravalo P., 2008. *J. Food. Prot.*, (71), 1996-2000.
4. Chemaly M. 2011. Journée Avicole et Cunicole d'Information et d'Echanges, Ploufragan.
5. Courtillon C., Toquin M.T., Le Nôtre Y., Fravalo P., Chemaly M., 2010. *Isopol*.
6. EFSA, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014;12(2):3547, 312 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547
7. Hunter P.R., Gaston M.A., 1988. *J. Clin. Microbiol.*, (26), 2465-2466.
8. Kérouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao T.T., Brisabois A., 2009. *J. Microbiol. Methods.*, (80), 134-137
9. Rivoal K., Fablet A., Courtillon C., Bougeard S., Chemaly M., Protais J., 2013. *Int. J. Food Microbiol.*, (166), 109-116.

Figure 1. Comparaison des profils PFGE des isolats analysés aux trois niveaux de la production de la filière dinde



Elevage C : élevage de chair, Elevage R : élevage reproducteur

Figure 2. Comparaison des profils PFGE des isolats analysés à la distribution.

Diversité génétique de *Listeria monocytogenes* en filière dinde



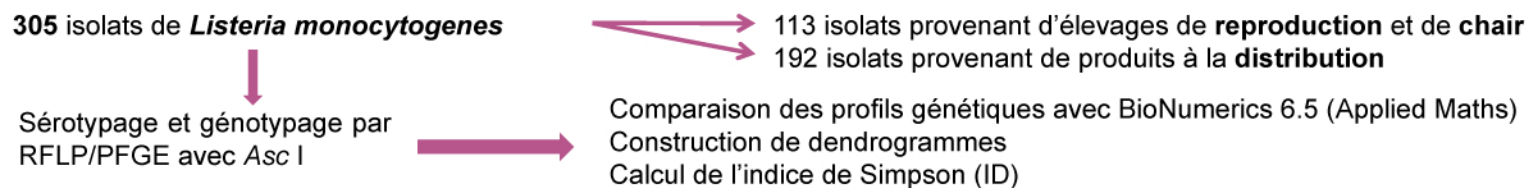
E. Houard*, S. Rouxel, A. Labbé, C. Courtilon, M. Chemaly

Anses, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, Laboratoire de Ploufragan, BP 53, 22440 Ploufragan – UEB, Université Européenne de Bretagne, France

Introduction

Listeria monocytogenes est une bactérie d'origine alimentaire responsable de la listériose, maladie infectieuse rare mais avec des conséquences graves. Dans la filière avicole, cette bactérie est prévalente dans les élevages de poules pondeuses (15 %), de poulets de chair (30 %) (Chemaly et al., 2008), de dindes de reproduction (12 %) et de chair (9 %) (Aury et al., 2011). L'objectif de ce travail est d'étudier la **diversité génétique** de *Listeria monocytogenes* issue de la **filière dinde** en France, de tracer et d'identifier les types de contamination de l'élevage jusqu'au produit fini.

Matériels et méthode



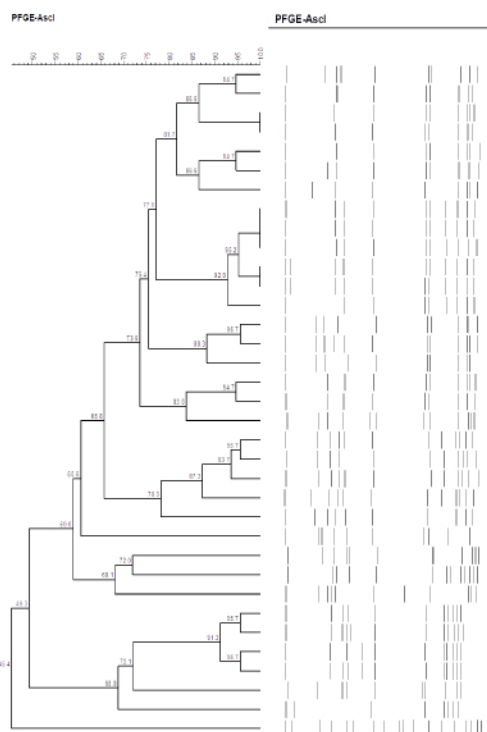
Résultats et discussion

Le séro groupe IIa est majoritaire aux 3 niveaux de la production de dindes et représente 84,6% des isolats de *L. monocytogenes*. L'ID des isolats de dindes du séro groupe IIa est de 0,698 (tableau 1).

Sérogroupe IIa		Diversité génétique	
Prévalence	84,6%	ID élevages	0,723
ID	0,698	ID distribution	0,898

Les isolats issus des élevages de dindes présentent une diversité génétique de 0,723, moins importante que ceux à la distribution (tableau 1).

Tableau 1 : Résultats de prévalence et d'indice de Simpson en filière dinde



Elevage C : élevage de chair, Elevage R : élevage reproducteur

Figure 1 : Comparaison des profils PFGE des isolats analysés aux trois niveaux de la production de la filière dinde

- 31 pulsotypes identifiés (figure 1).
- un profil (C85) commun aux 3 stades de la chaîne, un autre (C87) commun entre les stades de reproduction et d'élevage et un troisième (C74) identique à l'élevage et la distribution (figure 1).

Certains isolats sont capables de s'adapter aux conditions des étapes successives du process.

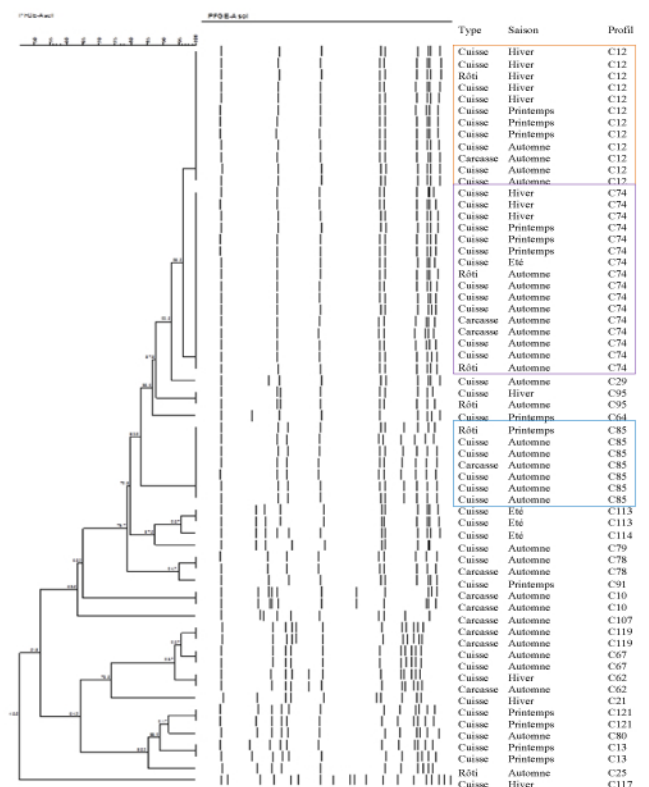


Figure 2. Comparaison des profils PFGE des isolats analysés à la distribution.

- A la distribution, 3 profils prédominants (C74, C12, C85) retrouvés sur des produits différents (carcasse, rôti, cuisse) toute l'année ou au moins sur 2 saisons (figure 2).

Ces résultats montrent une contamination croisée et persistante.

Conclusion

Cette première enquête épidémiologique moléculaire en filière dinde révèle que les élevages de reproduction et de chair peuvent être à l'origine de la contamination par *Listeria monocytogenes* des produits finis mais d'autres sources de contamination existent en raison de la diversité observée.

Références

Aury-Hainry K., Le Bouquin S., Labbé A., Petetin I., Chemaly M. 2011. *Listeria monocytogenes* contamination in french breeding and fattening turkey flocks. Journal of Food Protection. 74. 1096-1103.
Chemaly M., Toquin M.T., Le Nôtre Y., Fravallo P. 2008. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry production in France. Journal of Food Protection, 71(10), 1996-2000.